



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Toxoplasma gondii en carne de ganado ovino
Toxoplasma gondii in ovine meat

Autor/es

Amalia Xia García García

Director/es

María Jesús Gracia Salinas
Juan Antonio Castillo Hernández

Facultad de Veterinaria
2020

Índice

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
2.1.	<i>Toxoplasma gondii</i>	2
2.2.	Ciclo biológico	3
2.3.	Transmisión	6
2.4.	Toxoplasmosis	7
2.5.	<i>Toxoplasma gondii</i> en ganado ovino	10
3.	Justificación y objetivos	14
4.	Metodología	14
4.1.	Revisión bibliográfica	14
4.3.	Detección de <i>T. gondii</i> en carne	15
4.3.1.	Muestras	15
4.3.2.	Digestión péptica	15
4.3.3.	Extracción de ADN	18
4.3.4.	Optimización de la PCR a tiempo real (qPCR)	20
5.	Resultados y discusión	21
6.	Conclusiones	24
7.	Valoración personal	25
8.	Bibliografía	26

1. Resumen

La toxoplasmosis es una enfermedad de carácter zoonótico provocada por *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular con una amplia distribución mundial pues, se estima que un 25-30% de la población humana es seropositiva. Puede diseminarse rápidamente por el organismo alcanzando lugares donde la respuesta inmune es limitada, como es el tejido nervioso, muscular y cardíaco, provocando lesiones como coriorretinitis o meningoencefalitis, además de posibles desórdenes como la esquizofrenia o el trastorno bipolar. A su vez, es capaz de transmitirse de madre a hijo y puede generar abortos durante el embarazo o lesiones importantes en los fetos.

En el presente Trabajo de Fin de Grado se realiza una revisión bibliográfica de *T. gondii* y la toxoplasmosis, haciendo hincapié en la presencia de *T. gondii* en carne de ganado ovino. Con el fin de conocer la prevalencia en carne de esta especie en España, se han analizado 56 muestras de tejido muscular y se ha empleado la técnica qPCR para determinar la presencia de ADN del parásito. El 21'4% de las muestras analizadas estaban parasitadas, lo que demuestra que el consumo de carne contaminada puede suponer un riesgo para la salud.

Abstract

Toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by *Toxoplasma gondii*, an intracellular parasite which presents a worldwide spread, since it is estimated that 25-30% of human population is seropositive to *T. gondii*. It is able to spread through its host, reaching some places where the immune response is limited, such as nerve, muscle and cardiac muscle tissues. Because of this, it can produce chorioretinitis or meningoencephalitis, apart from some possible psychiatric disturbances like schizophrenia or bipolar disorder. Furthermore, it is possible a vertical transmission, in other words: infection can be passed to a developing baby if the mother becomes infected while pregnant. It can cause abortion or serious lesions to the foetus.

In this Final Degree Project general approach of *T. gondii* and toxoplasmosis is carried out, emphasizing the presence of *T. gondii* in ovine meat. In order to know the prevalence in meat of this species in Spain, 56 samples of muscle tissue have been analyzed and the qPCR technique has been used to determine the *T. gondii* DNA. The 21'4% of the analyzed samples were parasited, which shows that consumption of contaminated meat can be an important risk for human health.

2. Introducción

2.1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es el parásito responsable de la toxoplasmosis, aunque raramente produce el desarrollo de enfermedad severa en personas inmunocompetentes. No obstante, existen situaciones en las que sí puede generar una patología grave en fetos y recién nacidos infectados congénitamente; y en pacientes inmunocomprometidos (Robert-Gangneux et al., 2015; Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019). Este parásito presenta una amplia distribución a nivel mundial, pues se conoce que un 25-30% de la población está infectada (Robert-Gangneux, 2014).

T. gondii fue descrito por primera vez en 1908 por Seplendore en Brasil, y por Nicolle y Manceaux en África (Pérez et al., 2011). Estos últimos aislaron el agente de células mononucleares del bazo e hígado de *Ctenodactylus gundi*, un roedor africano, mientras que, Seplendore, lo descubrió en un conejo de laboratorio (Dubey, 2010). En cuanto a su clasificación taxonómica, en la actualidad se incluye en el reino Protista, subreino Protozoa, Phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoasida*, sub-clase *Coccidia*, orden *Eucoccidiorida*, sub-orden *Eimeria*, familia *Sarcocystidae*, género *Toxoplasma*, especie *T. gondii* (Artigas & Amores, 2012). Inicialmente se diferenciaron nueve especies en función del tipo de hospedador: *T. alencari*, *T. bahiensis*, *T. brumpti*, *T. colubri*, *T. gondii*, *T. hammondi*, *T. pardalis*, *T. ranae* y *T. serpai*. No obstante, años después se comprobó que todas estas especies compartían el mismo ciclo biológico y las mismas características inmunológicas, por lo que se agruparon todas en una misma especie: *T. gondii* (Weiss & Kim, 2013).

T. gondii ha sido descrito en más de 350 especies y su prevalencia está ligada a la proporción de felinos existentes en un determinado territorio (Robert-Gangneux, 2014). Esto le otorga una amplia distribución a nivel mundial (Alcaíno y Gorman, 2013), ya que se estima que un tercio de la población se encuentra infectada con *T. gondii*, cuya prevalencia varía según la edad de la población, los hábitos culturales y la localización geográfica pues, en las áreas con climas más cálidos existe un menor número de casos por toxoplasmosis (Kim & Kasper, 2015; Bayani et al., 2019).

2.2. Ciclo biológico

En el ciclo biológico de *T. gondii* hay tres estadios (Grandía, Entrena y Cruz, 2013; Jones & Dubey, 2010):

- **Taquizoito:** Del griego “Tachos”, que significa “velocidad”, haciendo referencia a la rapidez con la que se multiplica en las células del hospedador (Frenkel, 1973). Tiene forma arqueada, semilunar, cuyas dimensiones abarcan los 2-3 μm de ancho y los 5-7 μm de largo (Fig. 1A) (Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019). Presenta un núcleo verdadero, mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y una serie de orgánulos particulares necesarios para la penetración celular, tales como: el conoide, las micronemas, las roptrias y los microtúbulos. Para su reproducción necesita un medio intracelular, por lo que invaden las células de su huésped (Artigas & Amores, 2012; Botero y Restrepo, 2012; Hill, Chirukandoth & Dubey, 2005; Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Los taquizoitos se caracterizan por formar rosetas (Figura 2) y lisar la célula (Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019).

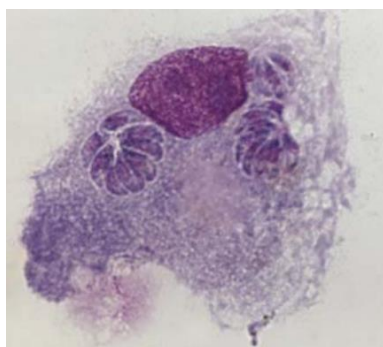


Figura 2: Tinción de Giemsa de dos rosetas formadas por taquizoitos en un macrófago. Extraído de: (Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019).

- **Esporozoito:** Se encuentran en los ooquistes esporulados (Figura 1B). Cada uno de éstos contiene dos esporoquistes, que a su vez presentan cuatro esporozoitos en su interior (Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019).
- **Bradizoito:** Del griego “Brady”, que significa “lento”, haciendo referencia a que se multiplican a menor velocidad que los taquizoitos (Frenkel, 1973). Presentan una forma de media luna y miden 7 x 1.5 μm aproximadamente. Forman quistes tisulares (Figura 1C), que pueden contener más de 1000 bradizoitos, y tienden a desarrollarse en el tejido nervioso, donde alcanza un diámetro de 50-70 μm , y en tejido muscular, llegando a medir 100 μm de longitud. También se han visto quistes tisulares en pulmones, hígado y riñones (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Sinai, Knoll & Weiss, 2020).

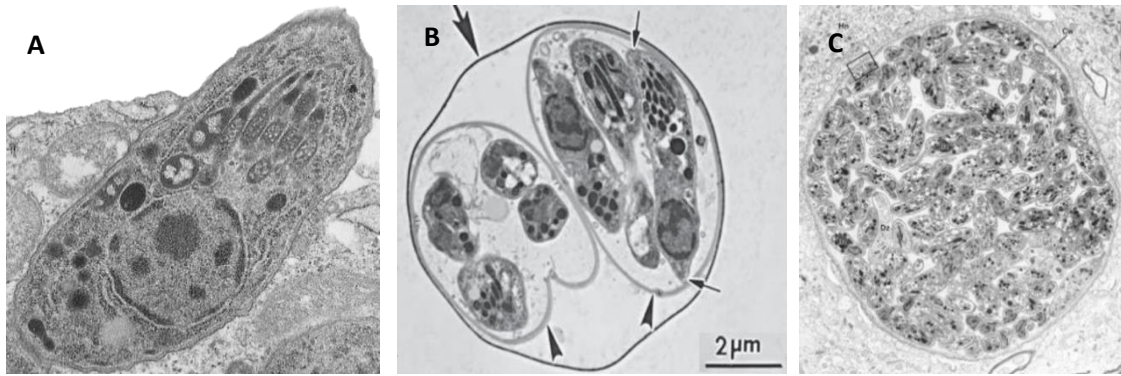


Figura 1. Los tres estadios de *T. gondii*. A) Taquizoito. B) Ooquiste esporulado. Se observan cuatro esporozoitos dentro de uno de los esporoquiste. C) Quiste tisular con varios bradizoitos en su interior. Extraído de: Dubey, Lindsay & Speer, 1998.

T. gondii presenta un ciclo heteroxeno, es decir, en él intervienen varios hospedadores (Palmezano, Plazas & Rojas, 2015), y cuenta con dos fases diferenciadas que incluyen una sexual en el gato, el hospedador definitivo, y otra asexual que tiene lugar en animales de sangre caliente (Yan et al., 2016) (Figura 3).

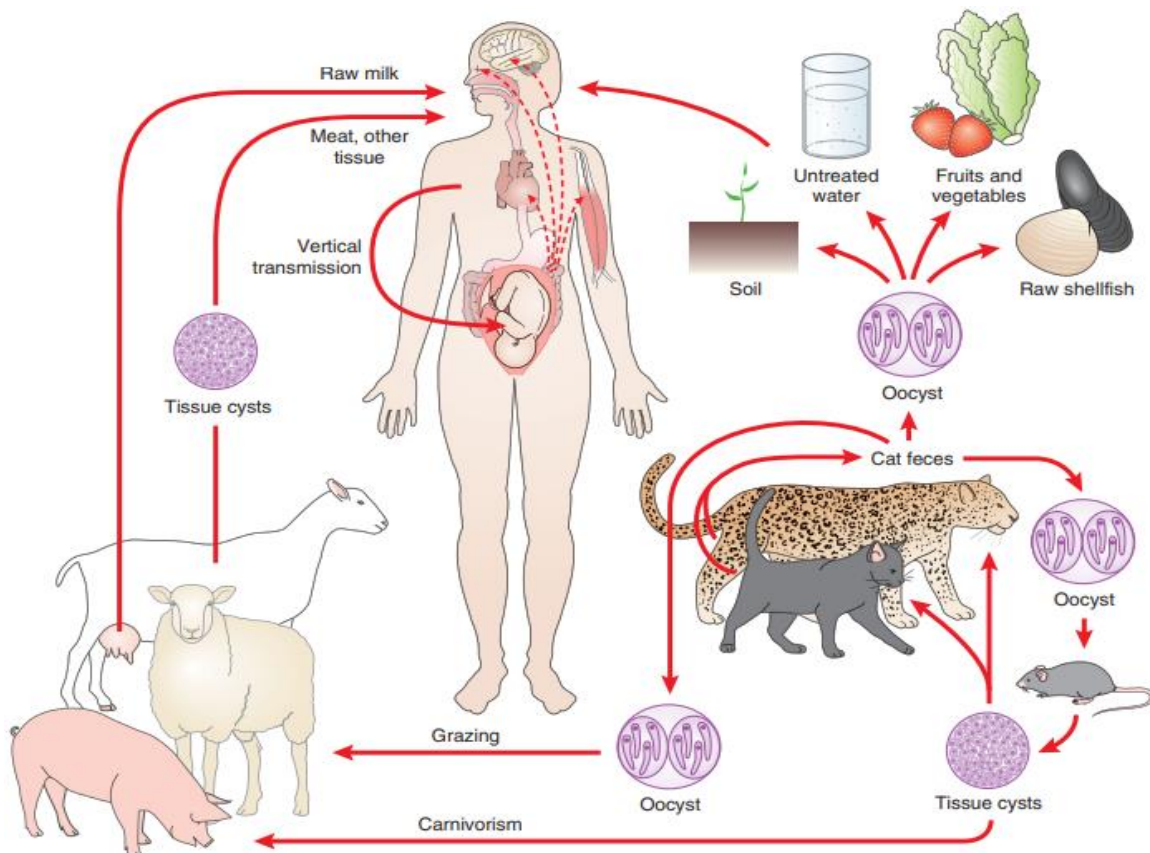


Figura 3. Esquematación de la transmisión y el ciclo de *T. gondii*. Extraído de: (Montoya, Boothroyd & Kovacs, 2019).

El hospedador definitivo ingiere alimentos contaminados con ooquiste o quistes tisulares que contienen bradizoitos, cuya pared es disuelta por la acción de las enzimas proteolíticas digestivas. Los esporozoitos y bradizoitos son liberados y penetran en el epitelio intestinal, donde desarrollan numerosas generaciones mediante esquizogonias o merogonias y se diferencian a formas sexuadas (Botero y Restrepo, 2012). Como resultado, se liberan merozoitos que inician la formación de los gametos a partir de los 3 días posinfección (p.i.), aunque puede variar e iniciarse hasta 15 días p.i. Los microgametos masculinos penetran los macrogametos femeninos y forman cigotos que, posteriormente, se transforman en ooquistes no esporulados. Éstos salen al lumen intestinal y son expulsados al exterior a través de las heces de gato (Kaye, 2011; Sullivan & Jeffers, 2012; Grandía, Entrena y Cruz, 2013) en un período de prepatencia que varía según la forma infectante que ingiere pues, en el caso de la ingestión de quistes tisulares o bradizoitos, el período es de 3-10 días; mientras que, si ingiere ooquistes, el período de prepatencia es de, al menos, 18 días (Dubey, 2006).

Cabe decir que, en el caso del gato, existe la posibilidad de que el parásito se disemine por todo el organismo, es decir, que se produzca una fase extraintestinal (Botero y Restrepo, 2012).

Una vez en el medio ambiente, los ooquistes esporulan en los cinco primeros días y adquieren capacidad infectante para los hospedadores intermediarios, en los que ocurre la fase asexual (Grandía, Entrena y Cruz, 2013). Tras la ingesta de alimentos contaminados con estos ooquistes, los esporozoitos son liberados e invaden tejidos tales como el endotelio vascular, los fibroblastos, las células mononucleadas y los leucocitos segmentados. Es allí donde se transforman en taquizoitos y sufren una multiplicación por endodiogenia, es decir, a partir de una célula original, se originan dos células hijas (Sullivan & Jeffers, 2012). Este proceso finaliza cuando la célula se lisa, liberando de esta manera entre 64 y 128 taquizoitos por cada célula (Black & Boothroyd, 2000) al torrente sanguíneo, diseminándose así por todo el organismo y desencadenando la fase de parasitemia. Al iniciarse la respuesta inmune, los taquizoitos se transforman en bradizoitos, que se multiplican lentamente hasta dar lugar a quistes tisulares durante la fase crónica de la enfermedad (Díaz et al, 2010), también denominado ciclo quístico (Botero y Restrepo, 2012). Estos quistes se localizan mayoritariamente en tejido nervioso, óseo, cardíaco y muscular dado que la respuesta inmune es limitada en esos sitios; y son importantes porque hacen posible la transmisión del parásito entre animales carnívoros ya que, al ingerir carne infectada, los bradizoitos penetran en el

intestino de los hospedadores y evolucionan nuevamente a taquizoitos (Díaz et al., 2010; Weilhammer et al., 2012; Palmezano, Plazas & Rojas, 2015; Dubey, 2020;).

Cabe destacar que, en este tipo de hospedadores, nunca tiene lugar la fase sexuada en el intestino, ergo, no se desarrollan ooquistes ni son expulsados al medio ambiente (Botero y Restrepo, 2012). Por tanto, este ciclo presenta tres fases: enteroepitelial, en el hospedador definitivo; extraintestinal, tanto en los seres humanos como en las aves y otros mamíferos de sangre caliente tales como los felinos; y esporogónica, que se produce en el medio ambiente (Grandía, Entrena y Cruz, 2013; Palmezano, Plazas & Rojas, 2015).

2.3. Transmisión

La ingestión de carne de mamífero o de ave cruda o insuficientemente cocinada que contiene quistes con bradizoitos, y la ingestión de comida y agua contaminadas con ooquistes esporulados, constituyen las principales fuentes de infección para el ser humano por el parásito *T. gondii* (Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019). La carne es el modo de transmisión que predomina en los países desarrollados, por ejemplo, en Europa supone el 30-63% de los casos y en Francia, el consumo de carne de cordero es un factor de riesgo considerable (Dardé & Peyron, 2013).

Otra vía de transmisión es la vertical, que implica que los taquizoitos son capaces de atravesar la barrera placentaria (Pérez et al., 2011). La transmisión congénita tiene lugar cuando una mujer seronegativa se infecta durante el embarazo, aunque también es posible en el caso de que una mujer seropositiva gestante esté inmunodeprimida, pues en dicha situación se puede reactivar la toxoplasmosis, ya que los bradizoitos contenidos en quistes pasan a tener las características invasivas de los taquizoitos (Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019). Esta vía de transmisión vertical también se produce en ratones y pequeños rumiantes (Hide, 2016).

A su vez, existe la transmisión a través del trasplante de un órgano infectado o de la transfusión de sangre contaminada (Montoya, Boothroyd & Kovacs. 2019). Si la persona que recibe el órgano trasplantado infectado no ha tenido previamente contacto con el parásito, existe una mayor probabilidad de que se reactiven los bradizoitos contenidos en éste y que, por tanto, desarrolle la enfermedad. Cabe decir que estos pacientes están inmunodeprimidos, ergo, son más susceptibles a las consecuencias de la toxoplasmosis (Pérez et al., 2011).

Por último, aunque menos estudiadas, están la transmisión sexual, la transmisión mediante transmisores mecánicos (perros, moluscos y artrópodos) y la transmisión por inhalación de ooquistes aerosolizados (Pérez et al, 2011).

2.4. Toxoplasmosis

En función de las manifestaciones clínicas, se puede distinguir tres situaciones:

1. INFECCIÓN PRIMARIA EN LA PERSONA CON BUENA RESPUESTA INMUNITARIA

La mayoría de las infecciones agudas son asintomáticas. El 10-20% presentan síntomas después de un periodo de incubación de 1-2 semanas, los cuales comprenden fiebre leve, cefalea, malestar, irritación faríngea, mialgia, exantema, hepatoesplenomegalia o linfadenopatía, que es la manifestación más frecuente, pues en el 20-30% de los casos los pacientes la muestran, y puede persistir durante semanas o meses. Asimismo, en menor medida puede manifestarse con retinoroiditis, ceguera, neumonitis, polimiositis, meningoencefalitis, hepatitis o miocarditis. También se ha observado que los quistes tisulares pueden provocar una reacción de hipersensibilidad cuando se rompen (Botero y Restrepo, 2012). A su vez, se ha señalado la posible relación entre la toxoplasmosis y el desarrollo de trastornos psiquiátricos como pueden ser la esquizofrenia y el trastorno bipolar. En la mayoría de los pacientes no inmunocomprometidos se produce la recuperación espontánea en unos meses (Mondragón y Muñiz, 2009; Carod, 2014; Kim & Kasper, 2015; Rosenthal, 2017).

2. INFECCIÓN CONGÉNITA

La infección congénita ocurre como resultado de la transmisión de *T. gondii* durante el embarazo en una mujer que carece de inmunidad frente al parásito. La infección fetal se genera en el 30-50% de los casos, aunque el riesgo varía según la edad gestacional en la que se encuentra la madre cuando se produce la infección (Tabla 1).

Trimestre	Riesgo de infección fetal
Primero	10-25%
Segundo	30-50%
Tercero	≥ 60%

Tabla 1. Correlación entre el trimestre de embarazo y el riesgo de infección fetal. Extraído de: (Rosenthal, 2017).

No obstante, la intensidad clínica del trastorno que puede afectar al feto disminuye conforme avanza el embarazo por lo que, si la infección se produce al principio, lo que puede provocar es un aborto espontáneo, mortinatos o enfermedad neonatal grave que implica síntomas neurológicos, que incluyen convulsiones, retraso psicomotor, sordera e hidrocefalia o microcefalia, y calcificaciones intracraneales. A su vez, puede haber retinocoroiditis y otras lesiones oculares que comprometen la visión. Las manifestaciones sistémicas son las mismas que en la infección aguda de pacientes inmunocompetentes, aunque puede producir ictericia, vómitos, diarreas e hipotermia, en vez de fiebre. Por otro lado, si la infección sucede cuando la gestación está en estado avanzado, es menos frecuente que produzca afecciones graves, pues la mayoría de los lactantes nacen sin presentar manifestaciones clínicas, aunque cabe la posibilidad de que desarrollen ciertas anomalías con el transcurso del tiempo, entre ellas, la más común es la retinocoroiditis. Esta manifestación de la toxoplasmosis congénita se caracteriza por mostrar dolor, fotofobia y alteraciones visuales, aunque raramente evoluciona a glaucoma o produce ceguera. También puede ir acompañada de uveítis. Se presenta con mayor frecuencia en adolescentes o adultos jóvenes, aunque también se desarrolla en personas que adquieren la infección muy al inicio de la vida (Kim & Kasper, 2015; Rosenthal, 2017; Cunningham et al., 2019). En Francia y en Austria, el examen rutinario en embarazadas ha contribuido a la disminución de la incidencia de la toxoplasmosis congénita (Cunningham et al., 2019).

3. ENFERMEDAD EN INDIVIDUOS CON INMUNODEPRESIÓN

Los individuos con sida, cáncer o que reciben fármacos inmunodepresores, son los más susceptibles a sufrir esta enfermedad, pues su condición favorece a la reactivación de una infección latente o a la infección a través de una transfusión de sangre o un trasplante de órganos. En enfermos con sida, la toxoplasmosis supone la enfermedad oportunista más habitual del sistema nervioso central. El cuadro clínico más frecuente es el de una encefalitis, cuya presentación, por lo general, es en forma subaguda acompañada de fiebre, cefalea, alteración del estado mental, manifestaciones neurológicas focales y lesiones cerebrales necrosantes. Por otra parte, las manifestaciones menos habituales de toxoplasmosis en estos pacientes son la coriorretinitis, con dolor ocular y alteraciones visuales; y la neumonitis, con fiebre, tos y disnea. Los sujetos con neoplasias malignas hematológicas o que reciben tratamiento con inmunodepresores, padecen una toxoplasmosis similar a la de las personas

con sida, pero con la diferencia de que los síntomas más frecuentes son la neumonitis y la miocarditis (Tierney, Saint & Whooley, 2011; Kim & Kasper, 2015; Rosenthal, 2017).

Para llevar a cabo el diagnóstico, se utilizan pruebas que incluyen cultivos, así como su aislamiento en sangre o líquidos corporales, ya sea a través de la identificación del parásito en muestras de tejido, de quistes en la placenta o tejidos fetales. También se hace uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar *in vitro* selectivamente un segmento específico de ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito. Es importante tener en cuenta que la presencia del parásito en líquidos corporales indica una infección aguda, mientras que su aislamiento en muestras de tejido refleja la presencia de quistes tisulares, indicando un proceso crónico (Domínguez, Winberg & Levin, 2010; Tierney, Saint & Whooley, 2011; Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013; Kim & Kasper, 2015; Rosenthal, 2017). Por otra parte, el diagnóstico serológico es el más utilizado. Los anticuerpos IgG, medidos con la prueba de pigmento de Sabín-Feldman, inmunofluorescencia indirecta, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) o aglutinación de partículas, se vuelven detectables 1-3 semanas después de la infección, y alcanzan su nivel máximo 1-2 meses después, tras el cual sufren una caída hasta un nivel basal que persiste toda la vida. En cuanto a los anticuerpos IgM, aparecen antes, pero disminuyen con mayor rapidez, por lo que es necesario medir sus niveles junto con el valor IgG para determinar cuándo se produjo la infección. Por último, el diagnóstico de la infección congénita requiere una combinación de ecografía y PCR de líquido amniótico o prueba serológica de la sangre del cordón, aunque la segunda es muy sensible y conlleva menos riesgos que la punción del cordón (Domínguez, Winberg & Levin, 2010; Kim & Kasper, 2015).

Generalmente las personas inmunocompetentes se recuperan sin la necesidad de tratamiento, pero cuando la infección es grave, se opta por administrar pirimetamina, sulfadiazina y leucovorina (ácido fólico) durante 12 meses, en el caso de los recién nacidos con toxoplasmosis congénita, y al menos durante 4-6 semanas en pacientes inmunocomprometidos. Para embarazadas se recomienda el uso de espiramicina, un antibiótico, cuando la infección es adquirida, diagnosticada antes de la semana 18 de embarazo y no hay sospechas de que el feto la haya adquirido. En el caso de que se adquiriera a partir de la semana 18 o existan sospechas de que el feto tiene la infección, se utilizan los otros medicamentos mencionados anteriormente (Centers for Disease Control and Prevention, 2018).

Para la prevención, es importante tener en cuenta que el parásito es susceptible de morir a 65 °C, por lo que la correcta cocción de los alimentos, y la pasteurización en el caso de

la leche, es un buen método para prevenir la infección (Lundén & Uggla, 1992). Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomiendan utilizar un termómetro para alimentos con el fin de asegurarse de que la carne está bien cocinada, así como pelar y lavar bien la fruta y la verdura antes de consumirlas. Para trozos de carne enteros (excepto aves de corral), se debe cocinar al menos a 63 °C, asegurándose de que se alcanza esa temperatura en el centro de la pieza, y hay que dejarlas reposar al menos 3 minutos antes de cortarla y consumirla para garantizar la destrucción del parásito. Para carne picada (excepto aves de corral), se debe cocinar al menos a 71 °C y no necesita tiempos de reposo. En cuanto a la carne de ave, debe cocinarse a más de 74 °C y debe dejarse reposar durante 3 minutos también; en el caso del mulso, debe alcanzarse una temperatura de 82 °C. Por otra parte, la congelación de la carne a una temperatura inferior a -20 °C durante al menos 3 días ayuda a disminuir el riesgo de infección. La refrigeración normal no es un método eficaz, al igual que el microondas, puesto que calienta el alimento de manera irregular (CDC, 2018; Mirza et al., 2018).

2.5. *Toxoplasma gondii* en ganado ovino

T. gondii en ganado ovino se caracteriza por producir problemas reproductivos y abortos, así como la reducción total o parcial de la producción de leche, lo que conlleva a grandes pérdidas económicas (Dubey, 2020) pues, se calcula que el 10-25% de los abortos en Europa y Estados Unidos, y el 3-54% en Sudamérica, se deben a esta patología. A su vez, existen otros dos factores que ocasionan costes económicos: las medidas de prevención, a través de la vacunación (Carson, 2018), y los servicios veterinarios, en los que se incluyen el tratamiento de los animales afectados, el diagnóstico laboratorial, la extracción de los corderos momificados, el tratamiento para los problemas de fertilidad, etc. (Stelzera et al., 2019). Por ejemplo, Freyre et al. (1997) observan en su estudio que se produce una pérdida anual de 1'4-4'68M US\$ en Uruguay mientras que, por su parte, Bennett & Ijpelaar (2005) determinan que en Gran Bretaña se pierden 12'3M £ al año por la toxoplasmosis. A su vez, Ryan O'Handley realiza un estudio en Australia Meridional que estima una pérdida de 70M AU\$ en 2017 (Fowler, 2017). En el caso de la Unión Europea, se estima que la toxoplasmosis ovina produce aborto en 680000-1360000 ovejas. Para cuantificar el impacto económico que puede conllevar, en el año 2017 se realiza un estudio en una explotación lechera situada en Palencia y se llega a la conclusión de que se pueden perder más de 100€ por aborto, por lo que las pérdidas económicas son considerables (Gutiérrez-Expósito et al., 2018).

Cuando la toxoplasmosis es adquirida a través de la ingesta de ooquistes esporulados, se observa fiebre y pérdida de apetito a los 3-6 días p.i., mientras que, en la toxoplasmosis congénita, la gravedad de la clínica depende del momento de la gestación en el que se encuentra la madre cuando se produce la infección (Stelzera et al., 2019).

Se han encontrado anticuerpos para *T. gondii* en ovejas de todo el mundo, más en adultas que en corderos. Se utilizan pruebas serológicas que incluyen el test ELISA, el test de diagnóstico indirecto por inmunofluorescencia (IFAT) y la prueba de hemaglutinación indirecta (IHA) (Glor et al., 2013; Wyrosdick & Schaefer, 2015), aunque la que ha demostrado tener mayor sensibilidad es el test de aglutinación modificada (MAT) (Satbige, 2016).

Los estudios de seroprevalencia realizados en ganado ovino en diversos países indican una alta presencia del parásito. Por ejemplo, en Europa se ha observado una alta seroprevalencia de *T. gondii* en ganado ovino: 48'6% (729/1501) en Grecia (Tzanidakis et al., 2012); 59'3% en el norte de Italia (Gazzonis et al., 2015); 33'6% en el norte de Portugal (Lopes et al., 2013); 28'6% según un estudio realizado en Italia (Gazzonis et al., 2020), que determinó la presencia de anticuerpos frente a *Toxoplasma* en muestras de jugo de carne procedentes de 227 ovejas mediante la técnica ELISA; 47% en Polonia (Moskwa et al., 2018); 74% (2619/3539) en Reino Unido (Hutchinson et al., 2011); 23% en los países nórdicos y del mar báltico (Olsen et al., 2019); 84'5% en Serbia (Klun et al., 2006); y 41'71% (667/1599) en Estonia (Tagel et al., 2019). En el caso de España, un estudio realizado por García-Bocanegra et al. (2013) reveló una prevalencia del 49'3% (248/503) en el sur del país, aunque en un estudio más reciente realizado en la misma zona, se determinó un 41'2% (Almería et al., 2018). Por otro lado, en el noroeste de España se vio una prevalencia que alcanzaba el 48% (Díaz et al., 2016).

El consumo de carne de ovino y caprino infectada es importante desde el punto de vista sanitario porque constituye una de las rutas de transmisión más comunes para el ser humano. En Europa, se estima que el 17'6% de las enfermedades provocadas por la ingesta de comida contaminada son debidas a *T. gondii* (Havelaar et. Al, 2015).

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) o PCR cuantitativa, un procedimiento rápido y con alta sensibilidad que permite cuantificar y detectar de manera específica a *T. gondii* en el tejido (Stelzera et al., 2019). La qPCR sigue los mismos principios básicos de la PCR, la diferencia radica en que la detección de los productos amplificados ocurre en cada ciclo de la reacción y, por tanto, no es necesario el uso de gel de agarosa. Asimismo, se puede cuantificar la cantidad de ADN de la muestra (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013). Aunque el

bioensayo en ratón o en gato es la prueba de oro para el diagnóstico de *T. gondii* en tejidos, es un procedimiento caro, requiere más tiempo que la PCR y conlleva implicaciones éticas (Opsteegh et al., 2020).

En una investigación realizada por Belluco et al. (2016) se recopilaron datos procedentes de varios estudios sobre la prevalencia en carne de ovino a nivel mundial. Los continentes con mayores prevalencias son Asia y África, con un 33'3% y un 30'7% respectivamente, seguidos de América (25'8%), Europa (18'1%) y Oceanía (0%). En general se observa una mayor prevalencia en adultos. Cabe decir que en la actualidad no existen estudios en España sobre la presencia de *T. gondii* en carne de ovino.

A continuación, se exponen datos sobre las prevalencias en tejidos ovinos en varios países (Tabla 2):

Continente	País	Edad*	Prevalencia	Referencia
Europa	Suiza	Adulto	3'3% (5/150)	(Berger-Schoch et al., 2011)
		Cordero	0% (0/100)	
	Irlanda	NS	3'6% (3/83)	(Halová et al., 2012)
	Inglaterra	Cordero	66'67% (6/9)	(Aspinall et al., 2002)
		Cordero	6'2% (14/226)	(Mason, Quinnell & Smith, 2010)
		Cordero	10'2% (24/236)	
	Escocia	NS	24'9% (80/321)	(Jackson, Hutchison & Sim, 1987)
	Francia	Adulto	42% (34/82)	(Halos et al., 2010)
		Cordero	2% (14/315)	
	Portugal	NS	17'6% (6/34)	(Lopes et al., 2015)
	Italia	NS	23'1% (15/65)	(Gazzonis et al., 2020)
África	Marruecos	NS	30% (15/50)	(Belbacha et al., 2004)
	Túnez	Adulto	50% (17/34)	(Boughattas et al., 2014)
		NS	20'3% (36/177)	(Gharbi et al., 2013)
		Adulto	5'7% (4/70)	(Khayeche et al., 2013)
	Etiopía	NS	57'4% (27/47)	(Gebremedhin et al., 2014)

	Egipto	NS	20'9% (28/134)	(Hassanain et al., 2011)
Asia	Jordania	NS	32'3% (43/133)	(Abu-Dalbouh et al., 2011)
	Irán	Adulto	37'5% (21/56)	(Asgari et al., 2010)
		Cordero	28% (14/50)	(Mahami-Oskouei et al., 2017)
		1-2 años	35'29% (6/17)	(Azizi et al., 2014)
		> 2 años	52'94% (9/17)	
		Cordero	25% (4/16)	
	Turquía	NS	20% (4/20)	(Ergin et al., 2009)
		1 año	55'5% (35/63)	(Yildiz et al., 2014)
		2 años	30% (7/21)	
		3 años	25% (3/12)	
		4 años	25% (1/4)	
América	Brasil	NS	33% (22/66)	(da Silva et al., 2011)
		NS	19'5% (16/82)	(Ragozo et al., 2008)
		NS	7'7% (3/39)	(da Silva & Langoni, 2001)
	México	NS	7'5% (23/305)	(Martínez et al., 2017)
	Estados Unidos	NS	9'2% (8/86)	(Jacobs, Remington & Melton, 1960)
		Cordero	77'9% (53/68)	(Dubey et al., 2008)
Oceanía	Australia	Cordero	0% (0/30)	(Rothe, McDonald & Johnson, 1985)

Tabla 2. Prevalencias de *T. gondii* en carne de ovino en distintos países.

* Cordero: < 12 meses; Adulto: > 12 meses; NS: edad desconocida

Como método de prevención, se debe evitar el acceso de gatos a los sitios donde se almacena la comida y el agua que se le suministra al ganado, y evitar que transiten zonas en las que se encuentran las ovejas, sobre todo si hay hembras gestantes. Asimismo, es recomendable llevar a cabo el control de roedores. No obstante, estas medidas no son efectivas para controlar la toxoplasmosis, por lo que habría que combinarlas con la vacunación, cuyo objetivo es prevenir la transmisión horizontal. En la actualidad se utiliza una vacuna atenuada que contiene taquizoitos viables de *T. gondii* de la cepa S48 (Toxovax™) y

que aporta protección frente a los abortos inducidos por este parásito, así como una reducción en el desarrollo de los quistes tisulares. Sin embargo, existen inconvenientes a la hora de usar este método puesto que se trata de una vacuna viva, por lo que es susceptible de provocar enfermedad al ser humano. Los operarios deben ir protegidos y se debe evitar que mujeres gestantes y personas inmunodeficientes la manejen (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, 2014; Sánchez-Sánchez et al., 2018). Por otro lado, los fármacos también parecen ser una buena alternativa para controlar esta infección. El tratamiento debería centrarse en 3 aspectos: quimioterapia o quimioprofilaxis en las ovejas adultas, tratamiento en corderos que nacen con toxoplasmosis congénita y tratamiento en el hospedador definitivo.

3. Justificación y objetivos

Debido a la importancia que supone la transmisión de *T. gondii* a través del consumo de carne y la falta de estudios en España en los que se analice la presencia de dicho parásito en tejidos ovinos, el objetivo de este TFG ha sido estudiar la prevalencia de *T. gondii* en tejidos de ganado ovino mediante qPCR.

4. Metodología

4.1. Revisión bibliográfica

Para la realización de la revisión bibliográfica de este TFG se ha utilizado como principal motor de búsqueda “*Web of Science*”, cuyo acceso ha sido proporcionado por la biblioteca de la Universidad de Zaragoza. Éste ha permitido buscar artículos de revistas y publicaciones de carácter científico en varias bases de datos, tales como *SciELO* y *Pubmed* (éste último, es un recurso de “*National Center for Biotechnology Information*”). Asimismo, se ha hecho uso de *Google Academic* y *ScienceDirect* para completar la información contenida en el trabajo y contrastar las diferentes fuentes bibliográficas. También se ha consultado el manual proporcionado por la OIE sobre animales terrestres, con el fin de extraer datos de interés sobre la toxoplasmosis. Para estas búsquedas, se han empleado términos como “*Toxoplasma gondii*”, “*Toxoplasma gondii in ovine*”, “*Toxoplasma gondii in ovine meat*” o “*Toxoplasma gondii real time PCR*”. Se ha llevado a cabo una selección de artículos en función del año en el que se publicaron, dando preferencia a los que han sido publicados más recientemente para obtener información actualizada sobre el tema. Por otro lado, para el

apartado de toxoplasmosis en humana, se han utilizado los recursos electrónicos proporcionados también por la Universidad de Zaragoza, accediendo de esta manera a *AccessMedicina*, un recurso médico online de la editorial *McGraw-Hill* que pone bibliografía médica a disposición del alumno.

4.3. Detección de *T. gondii* en carne

En cuanto a la parte práctica de este TFG, ésta se ha llevado a cabo en el laboratorio de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Las muestras han sido sometidas a una digestión péptica con el objetivo de liberar al parásito de los quistes tisulares contenidos en el tejido fresco. Posteriormente se ha procedido a la extracción de ADN y, a partir de esta muestra, se ha determinado la posible presencia de *T. gondii* mediante la técnica qPCR. Por último, se ha utilizado la hoja de cálculo Excel para el tratamiento de los datos y se ha realizado una comparación de los resultados obtenidos con otros estudios de seroprevalencia realizados en otros países que evalúan la presencia del parásito en tejidos de ovino.

4.3.1. Muestras

Se han procesado muestras de tejido muscular procedentes de 56 ovejas sacrificadas en un matadero de Tomelloso, situado en Ciudad Real, decomisadas por “parasitosis” (*Sarcocystis spp*). Los tejidos se reciben en botes (uno por cada animal sacrificado) que están en refrigeración y que corresponden a abdomen, axila y tercio posterior. Se pesan 10 gr de muestra de cada bote, incluyendo trozos de los tres tipos de músculo mencionados anteriormente. Se les quita la fascia y la grasa, para evitar que intervengan en la actividad de la pepsina y se cortan en trozos pequeños. En cada jornada se procesan 8 botes, por lo que se trabaja con 8 muestras

4.3.2. Digestión péptica

Este procedimiento tiene como objetivo simular las condiciones fisiológicas de digestión de la carne fresca que se producen en el organismo de un animal vivo. Este proceso provoca la rotura de la pared de los quistes tisulares de *T. gondii* y la liberación de los

bradizoitos de su interior, así como concentrar la muestra y con ello permitir analizar una mayor cantidad de tejido.

Los materiales empleados fueron:

- Espátula de metal
- Morteros
- Pipetas de 5 mL y 10 mL
- Pipeta de Pasteur
- Pipeteador automático
- Pinzas de disección y tijeras
- Micropipetas
- Tubos de Falcon de 50 mL
- Tubos de Eppendorf con tapa
- Matraces de 500 mL y 1000 mL
- Papel Parafilm
- Embudos de diámetro medio
- Gradillas para tubos de 50 mL y para Eppendorf

Los reactivos utilizados fueron:

- Solución de NaCl al 0'85%.
- Solución péptica
- Solución tampón fosfato salino (PBS)
- Solución de Bicarbonato sódico al 1'2%

Los equipos que se usaron fueron:

- Báscula
- Agitador magnético con y sin calefacción
- Vórtex
- pHmetro
- Centrífuga para tubos de 50 mL

PROCEDIMIENTO

Se preparan 250 mL de una solución de NaCl al 0'85% en un matraz. Para ello se utilizan 250 mL de agua destilada y se le añaden 2'1 gr de NaCl. Por otro lado, se preparan 250 mL de solución péptica en un matraz aparte. En este caso se emplean 250 mL de agua destilada, 1'3 gr de pepsina, 2'5 gr de NaCl y 3'5 mL de HCl. Es importante controlar dos parámetros en concreto a la hora de elaborar esta solución: el pH, pues el óptimo es 1'1-1'2; y la temperatura, la cual ha de ser de 37 °C, dado que la pepsina es una enzima sensible a temperaturas más bajas.

En cuanto a las muestras de tejido muscular, se reciben en botes y se procesan como se ha comentado anteriormente. Se deposita cada muestra en un mortero y se corta en trozos de menor tamaño con ayuda de unas pinzas de disección y unas tijeras con el objetivo de simular la masticación. Se le añaden 20 mL de NaCl a cada uno y se machaca, vertiendo cada mezcla resultante en un matraz. Posteriormente se le añade a cada matraz 20 mL de solución péptica y un imán, y se cierra con parafilm y papel de aluminio. Por último, los matraces se introducen en una estufa a 37 °C sobre agitadores magnéticos durante 30 minutos.

Mientras tanto, se prepara el material para el filtrado: se coloca en una gradilla un tubo de Falcon de 50 mL por cada muestra y se pone un embudo con filtro por cada tubo. A su vez, se prepara la solución de bicarbonato sódico al 1'2%, para la cual se usan 200 mL de agua destilada y 2'4 gr de NaHCO_3 . Se mide el pH ya que éste debe ser pH 8'3.

Una vez transcurrido el tiempo en la estufa, se sacan los matraces y se vuelca cada uno en un embudo con el fin de filtrar el contenido y recogerlo en los tubos de Falcon. Una vez realizado este paso, se añaden 25 mL de solución de bicarbonato a cada tubo, se centrifugan sin tape durante 10 minutos a 2800 revoluciones por minuto (rpm) y se retira el sobrante, puesto que lo que interesa es el pellet que queda. Ahora se añaden 50 mL de solución de PBS y se centrifuga con los mismos parámetros previamente citados. Este último paso se repite una vez más.


Cuando se obtiene el pellet final, se le añade 1'5 mL de PBS, se homogeniza con ayuda de una pipeta de Pasteur y se suspende la muestra en un tubo de Eppendorf. Finalmente se identifica la muestra y se guarda en el congelador.

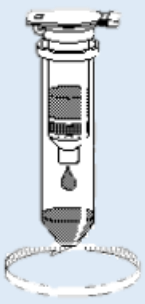


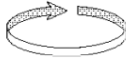


4.3.3. Extracción de ADN

Para este procedimiento se ha utilizado el *SpeedTools Tissue DNA extraction kit*, fabricado por BIOTOOLS B&M Labs, S.A. Este kit incluye el siguiente material:

- Buffer BT1
- Buffer BB3
- Buffer BB5 (concentrado)
- Buffer BBW
- Buffer BBE
- Proteinase K (líofilizado)
- Proteinase Buffer (PB)
- Columnas para unión del ADN
- Collecting tubes

En cuanto al protocolo, se ha seguido el expuesto a continuación (Tabla 3):

Paso	Descripción	
1	LISIS DE LA MUESTRA Se sacan X muestras del congelador y se suspende 200 µL de cada una en diferentes tubos de Eppendorf. Se le añaden 180 µL de Buffer BB3 y 25 µL de Proteinase K a cada uno, se mezcla con el vórtex y se incuban a 70 °C durante 30 minutos. Asimismo, se mete el Buffer BBE en la incubadora para pre-calentarlo.	 200 µL de muestra 200 µL <i>BUFFER BB3</i> 25 µL <i>PROTEINASE K</i> <i>Mix</i> Incubar a 70 °C 30 minutos
2	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA UNIÓN DE ADN A LA COLUMNA Se añaden 210 µL de etanol (96-100%) y se homogeniza con el vórtex.	 210 µL de etanol <i>Mix</i>

3	<p>UNIÓN DEL ADN</p> <p>Utilizar una columna para cada muestra (colocamos cada una en un Collecting tube de 2 mL) y se carga el lisado. Centrifugar durante 1 minuto a 11000 x g y descartar el filtrado que se obtiene. Colocar la columna nuevamente en el Collecting tube.</p>	 <p>Cargar lisado en la columna</p> <p>1 minuto, 11000 x g</p>
4	<p>LAVADOS DE MEMBRANA DE SÍLICA</p> <p><u>1^{er} LAVADO</u></p> <p>Añadir 500 µL Buffer BBW y centrifugar durante 1 minuto a 11000 x g. Descartar el filtrado que se obtiene y colocar la columna nuevamente en el Collecting tube</p>	 <p>Añadir</p>
	<p><u>2^{do} LAVADO</u></p> <p>Añadir 600 µL Buffer BB5 y centrifugar durante 1 minuto a 11000 x g. Descartar el filtrado que se obtiene y colocar la columna nuevamente en el Collecting tube</p>	 <p>500 µL <i>BUFFER BBW</i></p> <p>1 minuto, 11000 x g</p>
		 <p>600 µL <i>BUFFER BB5</i></p> <p>1 minuto, 11000 x g</p>
5	<p>SECADO DE LA MEMBRANA DE SÍLICA</p> <p>Centrifugar la columna durante 1 minuto a 11000 x g para eliminar el etanol residual</p>	 <p>1 minuto, 11000 x g</p>
6	<p>ELUCIÓN DE ADN PURO</p> <p>Transferir la columna a un tubo de Eppendorf y añadir 200 µL Buffer BBE (70 °C) directamente en la columna. Homogenizar y centrifugar durante un minuto a 11000 x g.</p>	 <p>200 µL <i>BUFFER BBE</i></p> <p>1 minuto, 11000 x g</p>


7	Tirar la columna y guardar en el congelador la muestra que queda en el tubo de Eppendorf.	 <p>Marcar muestra</p>
---	---	--

Tabla 3. Protocolo de extracción de ADN.

4.3.4. Optimización de la PCR a tiempo real (qPCR)

Se han utilizado 2 cebadores para la amplificación de ADN dirigida a la secuencia específica del elemento repetitivo de 529-pb, una secuencia que presenta 300 copias en el genoma de *T. gondii*:

- ToxoRoc F: TAGACGAGACGACGCTTTCC y ToxoRoc R: TCGCCCTCTTCTCCACTCT.
- ToxoRepeat 500 F: CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG, y ToxoRepeat 500 R: CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT

Para la realización de la qPCR se ha utilizado un termociclador en tiempo real CFX Connect™ de Bio-Rad Laboratories, con placas de 96 pocillos. En cada uno de éstos, se han puesto 10 µL de agua libre de nucleasas, 10 µL de Gotaq Sybergreen Master Mix de Promega (Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, buffers para la reacción, fluoróforo) y los cebadores (añadiendo 1 µL de cada uno de los cebadores del par por cada 50 µL del volumen total de agua y Master Mix utilizados). Finalmente, se añaden 2'25 µL de DNA de las muestras en la mitad de los pocillos de la placa y en la otra mitad se realiza una dilución 1/10 de cada una de las muestras. Se trabaja con un volumen de 20 µL de muestra y todas se hacen por triplicado.

El protocolo del termociclador que ha sido utilizado es el siguiente:

- Activación de la polimerasa: 94 °C durante 7 minutos para la activación enzimática.
- Ciclos de amplificación: 40 ciclos a 94 °C durante 5 segundos (desnaturalización); 55 °C durante 30 segundos (alineación) y 72 °C durante 10 segundos (extensión).
- Para finalizar: curva de disociación de 60 °C – 94 °C con un intervalo de aumento de 0'5°C.

En cada PCR se incluye un control positivo, un control negativo y una reacción separada para las copias de ADN de actina como control interno. Se consideran positivas

aquellas muestras que dan positivo, al menos, 2 veces (cada muestra se hace por triplicado). El valor umbral (Ct) debe ser inferior a 38 para que se considere positivo.

5. Resultados y discusión

Se han analizado un total de 56 muestras de tejido muscular de ovino, de las cuales, 12 han presentado el parásito, lo que supone una prevalencia del 21'4%. Los resultados (muestras positivas o negativas) de la qPCR para *T. gondii* han sido los expuestos en la tabla 4.

Muestras	Ct	Ct	Media	Muestras	Ct	Ct	Media
1	32'02	32'5	32'27	29	-	-	Negativo
2	-	-	Negativo	30	-	-	Negativo
3	-	-	Negativo	31	-	-	Negativo
4	-	-	Negativo	32	-	-	Negativo
5	-	-	Negativo	33	-	-	Negativo
6	-	-	Negativo	34	-	-	Negativo
7	-	-	Negativo	35	-	-	Negativo
8	-	-	Negativo	36	-	-	Negativo
9	-	-	Negativo	37	-	-	Negativo
10	-	-	Negativo	38	33'21	32'01	32'61
11	-	-	Negativo	39	30'47	29'35	29'91
12	-	-	Negativo	40	28'14	29'54	28'84
13	29'16	30'32	29'74	41	30'54	29'74	30'14
14	-	-	Negativo	42	-	-	Negativo
15	29'64	29'04	29'34	43	-	-	Negativo
16	-	-	Negativo	44	-	-	Negativo
17	-	-	Negativo	45	-	-	Negativo
18	-	-	Negativo	46	-	-	Negativo

19	-	-	Negativo	47	30'12	29'34	29'73
20	-	-	Negativo	48	31'64	33'12	32'38
21	-	-	Negativo	49	-	-	Negativo
22	-	-	Negativo	50	32'28	31'56	31'92
23	29'31	28'67	28'99	51	-	-	Negativo
24	-	-	Negativo	52	-	-	Negativo
25	-	-	Negativo	53	-	-	Negativo
26	-	-	Negativo	54	-	-	Negativo
27	30'02	29'34	29'68	55	-	-	Negativo
28	-	-	Negativo	56	-	-	Negativo

Tabla 4. Resultado y Ct obtenidos mediante qPCR.

Tras calcular la media (\bar{X}) de los resultados de este estudio, se determina que la prevalencia de *T. gondii* en carne de ovino es de 21'4% (Tabla 5).

	Número	%
Muestras positivas	12	21'4
Muestras negativas	44	78'6
Total	56	100

Tabla 5. Tabla de contingencia de las frecuencias de las muestras positivas y negativas a *T. gondii*.

En la actualidad, no existen estudios en España que determinen la presencia de *T. gondii* en carne de esta especie, por lo que este trabajo ha permitido conocer la prevalencia de este parásito en una zona concreta del país: Ciudad Real. El dato obtenido ha sido 21'4%, es decir, un total de 12 muestras positivas. La prevalencia ha sido elevada, similar a la media europea (18'1%) (Belluco et al. 2016), aunque el número de muestras analizadas es bajo, por lo que estos resultados se deben tomar con precaución.

Los datos obtenidos en este estudio son superiores a otros estudios realizados en Suiza (\bar{X} = 1'65%) (Berger-Schoch et al., 2011), Irlanda (3'6%) (Halová et al., 2012), Portugal (17'6%)

(Lopes et al., 2015), México (7'5%) (Martínez et al., 2017) y Australia (0%) (Rothe, McDonald & Johnson, 1985).

Por otro lado, son inferiores a otros estudios llevados a cabo en Inglaterra (\bar{X} =27'7) (Aspinall et al., 2002; Mason, Quinnell & Smith, 2010), Escocia (24'9%) (Jackson, Hutchison & Sim, 1987), Italia (23'1%) (Gazzonis et al., 2020), Marruecos (30%) (Belbacha et al., 2004), Túnez (\bar{X} =25'3%) (Gharbi et al., 2013; Khayeche et al., 2013; Boughattas et al., 2014), Etiopía (57'4%) (Gebremedhin et al., 2014), Jordania (32'3%) (Abu-Dalbouh et al., 2011), Irán (\bar{X} =35'7%) (Asgari et al., 2010; Azizi et al., 2014; Mahami-Oskouei et al., 2017), Turquía (\bar{X} =31'1%) (Ergin et al., 2009; Yildiz et al., 2014) y Estados Unidos (\bar{X} =43'55%) (Jacobs, Remington & Melton, 1960; Dubey et al., 2008).

Por último, se aprecia que los datos son parecidos a los obtenidos en Francia (\bar{X} =22%) (Halos et al., 2010; Lopes et al., 2015), Egipto (20'9%) (Hassanain et al., 2011) y Brasil (\bar{X} =20'9%) (da Silva & Langoni, 2001; Ragozo et al., 2008; da Silva et al., 2011).

La alta prevalencia obtenida en este TFG puede deberse a que las muestras utilizadas procedían de animales decomisados por tener *Sarcocystis* spp. Ambos parásitos comparten al gato como hospedador, lo que puede facilitar que la prevalencia haya sido más alta.

Los animales muestreados en este estudio han sido adultos y, en general, este grupo de edad ha mostrado una mayor prevalencia que los corderos a este parásito. Esto puede deberse a un factor ambiental y a la ruta de infección, puesto que los adultos están más expuestos al parásito y durante más tiempo (Halos et al., 2010; Katzer et al., 2011).

Asimismo, se debe tener en cuenta el tipo de tejido analizado, ya que en este estudio se han utilizado muestras de abdomen, axila y tercio posterior, mientras que, en Marruecos (30%), Irán (35'7%) y Turquía (31'1%) las prevalencias son, probablemente, superiores porque se han utilizado muestras de cerebro, lugar predilecto de este parásito en ganado ovino. En Francia (42% en adultos), Túnez (25'3%) y Etiopía (57'4%) se han usado muestras de músculo cardíaco, otro de los lugares predilectos (Esteban & Innes, 1998; Juránková et al., 2015).

A su vez, se observa discrepancia entre estudios de un mismo país. Por ejemplo, en Túnez la mayor prevalencia alcanza el 50%, mientras que, la más baja está por debajo del 6%. Esto puede deberse a que, aparte del tamaño de la muestra, en cada estudio se ha utilizado un protocolo de PCR distinto y, además, cabe la posibilidad de que la prueba haya podido dar falsos negativos, ya sea porque la muestra presentaba una carga parasitaria baja o que el animal albergaba al parásito en otros órganos como el cerebro o la lengua (Arwa & Wahiba, 2015). Por tanto, la técnica de diagnóstico empleada es otro factor a tener en cuenta.

Por otra parte, Estados Unidos (43'55%) y Etiopía (57'4%) parten de muestras procedentes de animales seropositivos a *T. gondii*, lo que podría constituir otro factor implicado en la obtención de resultados elevados.

Cabe recordar que los resultados de este TFG hay que tomarlos con precaución ya que el número de animales analizado no ha sido elevado. No obstante, esta investigación respalda la premisa de que el consumo de carne de ovino representa un factor de riesgo a considerar en España para el ser humano ya que más de 1/5 de las muestras han dado positivo a *T. gondii*. En matadero no hay control de este parásito, por lo que la responsabilidad recae sobre el consumidor. Para que la carne sea segura para el consumo, se debe cocinar bien o congelar. Se ha visto que los quistes tisulares permanecen viables a 52 °C durante 9'5 minutos, pero no cuando son sometidos a 58 °C durante el mismo período de tiempo. Asimismo, a 61 °C durante 3'6 minutos, los quistes dejan de ser viables (Dubey et al., 1990). Por otro lado, la temperatura de congelación óptima para que se produzca la pérdida de infectividad de los quistes es por debajo de los -20 °C durante al menos 3 días (Mirza et al., 2018).

6. Conclusiones

- Este trabajo constituye el primer estudio en España para conocer la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en carne de ovino.
- La prevalencia obtenida ha sido elevada (21'4%).
- La presencia de *T. gondii* en carne de ovino puede suponer un riesgo para el consumidor.
- Se debe continuar con los estudios, analizando un mayor número de muestras procedente de distintas zonas de España.

Conclusions

- This study is the first one in Spain which allows to know the prevalence of *Toxoplasma gondii* in ovine meat.
- The prevalence obtained has been high (21'4%).
- Presence of *T. gondii* can be a risk for consumer.
- More studies should be carried out to determine the prevalence in ovine meat.

7. Valoración personal

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores M^a Jesús Gracia Salinas y Juan Antonio Castillo Hernández, y a mis compañeras de la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Paz Peris Peris y María Serrano Prieto, por brindarme su ayuda en todo momento y hacer posible este TFG.

A través de la realización de este trabajo, he aprendido a buscar y contrastar información, así como citar libros, artículos bibliográficos, etc. He podido conocer tanto la biología como la clínica que produce *T. gondii*, destacando sus características más relevantes, y he proporcionado una visión general de la toxoplasmosis en el ganado ovino. A su vez, he trabajado en el laboratorio (más allá de las prácticas que oferta la universidad), lo que me ha permitido explorar más en profundidad el campo de la investigación. Ha sido muy enriquecedora e interesante la experiencia, y me apena no haber podido aprovecharla al máximo debido a las circunstancias del Covid-19. Habría sido interesante, por ejemplo, estudiar qué zonas del ovino (abdomen, axila y tercio posterior) presentaban una mayor frecuencia para *T. gondii*.

Por último, quiero mencionar que este Trabajo de Fin de Grado ha sido financiado por FEDER/Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades – Agencia Estatal de Investigación – Proyecto RTC-2017-6594-2.



“Promover el desarrollo tecnológico, la innovación y una investigación de calidad”

8. Bibliografía

- Abu-Dalbouh, M. A., Ababneh, M. M., Giadinis, N. D., & Lafi, S. Q. (2011). "Ovine and caprine toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) in aborted animals in Jordanian goat and sheep flocks". *Tropical Animal Health and Production*, 44(1), pp. 49–54. DOI: 10.1007/s11250-011-9885-2
- Alcaíno, H. y Gorman, T. (2013). "Zoonosis parasitarias transmitidas por perros o gatos al humano". En: Apt Baruch, W.L. *Parasitología humana*. Ciudad de México: McGraw-Hill, pp. 717-726.
- Almería, S., Cabezón, O., Paniagua, J., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Arenas-Montes, A., Dubey, J. P. & García-Bocanegra, I. (2018). "*Toxoplasma gondii* in sympatric domestic and wild ungulates in the Mediterranean ecosystem". *Parasitology Research*, 117(3), pp. 665–671. DOI: 10.1007/s00436-017-5705-6
- Artigas, R. & Amores W. (2012). Aspectos básicos sobre la patogenia, respuesta inmune y bioseguridad en el trabajo con *el Toxoplasma gondii*. *Correo Científico Médico*, 16(3).
- Arwa Lachkhem, I. L., & Wahiba Sakly, D. S. (2015). Prevalence of Toxoplasmosis in Sheep, Goats and Cattle in Southern Tunisia. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 06(05). DOI: 10.4172/2155-9597.1000245
- Asgari, Q., Sarnevesht, J., Kalantari, M., Sadat, S. J. A., Motazedian, M. H. & Sarkari, B. (2010). "Molecular survey of *Toxoplasma* infection in sheep and goat from Fars province, Southern Iran". *Tropical Animal Health and Production*, 43(2), pp. 389–392. DOI: 10.1007/s11250-010-9704-1
- Aspinall, T. V., Marlee, D., Hyde, J. E. & Sims, P. F. G. (2002). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction – food for thought?" *International Journal for Parasitology*, 32(9), pp. 1193–1199. DOI: 10.1016/s0020-7519(02)00070-x
- Azizi, H., Shiran, B., Boroujeni, A. B. & Jafari, M. (2014). "Molecular Survey of *Toxoplasma gondii* in Sheep, Cattle and Meat Products in Chaharmahal va Bakhtiari Province, Southwest of Iran". *Iran J Parasitol*, 9(3), pp. 429–34. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25678929/> [Consultado 14-06-2020]
- Bayani, M., Riahi, S. M., Bazrafshan, N., Ray Gamble, H., & Rostami, A. (2019). "*Toxoplasma gondii* infection and risk of Parkinson and Alzheimer diseases: A systematic review and meta-

analysis on observational studies". *Acta Tropica*, 196, pp. 165-171. DOI:10.1016/j.actatropica.2019.05.015

Belbacha, I., Hafid, J., Tran Manh Sung, R., Flori, P., Raberin, H., Aboufatima, R., Regragui, A., Dalal, A. & Chait, A. (2004). "*Toxoplasma gondii*: level of carriage in sheep of Marrakech region (Mnabha)". *Schweizer Arch Tierheilkd*, 146(12), pp. 561–564. DOI: 10.1024/0036-7281.146.12.561

Belluco, S., Mancin, M., Conficoni, D., Simonato, G., Pietrobelli, M. & Ricci, A. (2016). "Investigating the Determinants of *Toxoplasma gondii* Prevalence in Meat: A Systematic Review and Meta-Regression". *PLOS ONE*, 11(4), pp. e0153856. DOI: 10.1371/journal.pone.0153856

Bennett, R., & Ijpelaar, J. (2005). "Updated Estimates of the Costs Associated with Thirty Four Endemic Livestock Diseases in Great Britain: A Note". *Journal of Agricultural Economics*, 56(1), pp. 135-144. DOI:10.1111/j.1477-9552.2005.tb00126.x

Berger-Schoch, A. E., Herrmann, D. C., Schares, G., Müller, N., Bernet, D., Gottstein, B. & Frey, C. F. (2011). "Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland". *Veterinary Parasitology*, 177(3-4), pp. 290–297. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.11.046

Black, M. W. & Boothroyd, J. C. (2000). "Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), pp. 607-623. DOI: 10.1128/mmbr.64.3.607-623.2000

Botero, D., Restrepo, M. (2012). *Parasitosis humanas*. (5ª ed.) Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas CIB.

Boughattas, S., Ayari, K., Sa, T., Aoun, K., & Bouratbine, A. (2014). "Survey of the Parasite *Toxoplasma gondii* in Human Consumed Ovine Meat in Tunis City". *PLoS ONE*, 9(1), pp. e85044. DOI: 10.1371/journal.pone.0085044

Carod Artal, F. J. (2014). "Parasitosis del sistema nervioso central: neurocisticercosis, hidatidosis, neuroesquistosomiasis, toxoplasmosis y tripanosomiasis americana". *Meningitis, Encefalitis y Otras Infecciones Del SNC*. Elsevier, pp. 253–288. DOI: 10.1016/b978-84-9022-484-7.00015-x

Carson, A. (2018). "Abortion in sheep: an update". *Veterinary Record*, 183(17), pp. 528–529. DOI: 10.1136/vr.k4620

Centers for Disease Control and Prevention (2018). Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/> [Consultado 08-06-2020]

Cunningham, F. G., Leveno, K. J., Bloom, S. L., Dashe, J. S., Hoffman, B. L., Casey, B. M. & Spong, C. Y. (Ed.) (2019). *William Obstetrics* (25ª ed.). Ciudad de México: McGraw-Hill.

da Silva, A. V., & Langoni, H. (2001). "The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice, and the polymerase chain reaction (PCR)". *Veterinary Parasitology*, 97(3), pp. 193–200. DOI: 10.1016/s0304-4017(01)00404-6

da Silva, R. C., Langoni, H., Su, C. & Da Silva, A. V. (2011). "Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified". *Veterinary Parasitology*, 175(1-2), pp. 173–177. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.09.021

Dardé, M. L. & Peyron, F. (2013). "Toxoplasma y toxoplasmosis". EMC - Pediatría, 48(1), pp. 1-12. DOI: 10.1016/S1245-1789(13)64153-0

Díaz, L., Zambrano, B., Chacón, G., Rocha, A. & Díaz, S. (2010). "Toxoplasmosis y embarazo". *Revista de obstetricia y ginecología de Venezuela*, 70(3), pp. 190-205. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262630437_Toxoplasmosis_y_embarazo.

[Consultado: 19-04-2020]

Díaz, P., Cabanelas, E., Díaz-Cao, J. M., Vina, M., Bejar, J. P., Perez-Creo, A., Prieto, A., López, C. M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Banos, P. & Morondo, P. (2016). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in goats from north-western Spain". *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(4), pp. 587–590. DOI: 10.5604/12321966.1226851

Domínguez, S. R., Winberg, A. & Levin, M. J. (2010). "Infecciones: parasitarias y micóticas". En: Hay Jr., W. W., Levin, M. J., Sondheimer, J. M. & Deterding, R. R. (Ed.). *Diagnóstico y tratamientos pediátricos* (19ª ed.). Ciudad de México: McGraw-Hill, pp. 1183-1223.

Dubey, J. P. (2006). "Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts". *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), pp. 69-75. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.03.018

Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasmosis of animals and humans*. (2ª ed). CRC Press.

- Dubey, J. P. (2020). "The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*". En: Weiss, L. M. & Kim, K. (ed.) *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods* (3ª ed). Academic Press, pp. 1-19. DOI:10.1016/B978-0-12-815041-2.00001-3
- Dubey, J. P., Kotula, A. W., Sharar, A., Andrews, C. D. & Lindsay, D. S. (1990). "Effect of High Temperature on Infectivity of *Toxoplasma Gondii* Tissue Cysts in Pork". *J Parasitol*, 76(2), pp. 201-204. DOI: 10.2307/3283016
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S. & Speer, C. A. (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii*: Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts". *American Society for Microbiology*. 11(2), pp. 267-299. DOI: 10.1128/CMR.11.2.267
- Dubey, J. P., Sundar, N., Hill, D., Velmurugan, G. V., Bandini, L. A., Kwok, O. C. H., Majumdar, D. & Su, C. (2008). "High prevalence and abundant atypical genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from lambs destined for human consumption in the USA". *International Journal for Parasitology*, 38(8-9), pp. 999–1006. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.11.012
- Ergin, S., Ciftcioglu, G., Midilli, K., Issa, G., & Gargili, A. (2009). "Detection of *Toxoplasma gondii* from meat and meat products by the nested-PCR method and its relationship with seroprevalence in slaughtered animals". *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53, pp. 657-661. Disponible en: <https://url2.cl/S28FT> [Consultado 11-06-2020]
- Esteba Redondo, I., & Innes, E. (1998). "Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts". *International Journal for Parasitology*, 28(9), pp. 1459–1466. DOI: 10.1016/S0020-7519(98)00116-7
- Fowler, C. (2017). "New study estimates toxoplasmosis costs sheep industry \$70 million per year in South Australia". *ABC News*, 7 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.abc.net.au/news/rural/2017-02-07/toxoplasmosis-costs-south-australian-sheep-producers/8245676> [Consultado 04-05-2020]
- Frenkel, J. K. (1973). "Toxoplasma in and around us". *BioScience*, 23(6), pp. 343-352. DOI: 10.2307/1296513
- Freyre, A., Bonino, J., Falcón, J., Castells, D., Correa, O. & Casaretto, A. (1997). "The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay". *Veterinary Parasitology*, 73(1-2), pp. 13-15. DOI: 10.1016/S0304-4017(97)00069-1
- García-Bocanegra, I., Cabezón, O., Hernández, E., Martínez-Cruz, M. S., Martínez-Moreno, Á. & Martínez-Moreno, J. (2013). "*Toxoplasma gondii* in Ruminant Species (Cattle, Sheep, and

Goats) from Southern Spain". *Journal of Parasitology*, 99(3), pp. 438–440. DOI: 10.1645/12-27.1

Gazzonis, A. L., Veronesi, F., Di Cerbo, A. R., Zanzani, S. A., Molineri, G., Moretta, I., Moretti, A., Piergili Fioretti, D., Invernizzi, A. & Manfredi, M. T. (2015). "*Toxoplasma gondii* in small ruminants in Northern Italy - prevalence and risk factors". *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(1), pp. 62–68. DOI: 10.5604/12321966.1141370

Gazzonis, A. L., Zanzani, S. A., Villa, L. & Manfredi, M. T. (2020). "*Toxoplasma gondii* infection in meat-producing small ruminants: Meat juice serology and genotyping". *Parasitology International*, 76, pp. 102060. DOI: 10.1016/j.parint.2020.102060

Gebremedhin, E., Abdurahaman, M., Tessema, T., Tilahun, G., Cox, E., Goddeeris, B., Dorny, P., De Craeye, S., Dardé, M. L. & Ajzenberg, D. (2014). "Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption". *Parasites & Vectors*, 7(1), 425-437. DOI: 10.1186/1756-3305-7-425

Gharbi, M., Zribi, L., Jedidi, M., Chakkhari, H., Hamdi, S., R'hayem, S., Zribi, B., Souli, M. & Darghouth, M. A. (2013). "Prévalence d'infection des ovins par *Toxoplasma gondii* en Tunisie". *Bulletin de La Société de Pathologie Exotique*, 106(3), pp. 184–187. DOI: 10.1007/s13149-013-0290-4

Glor, S. B., Edelhofer, R., Grimm, F., Deplazes, P. & Basso, W. (2013). "Evaluation of a commercial ELISA kit for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum, plasma and meat juice from experimentally and naturally infected sheep". *Parasites & Vectors*, 6(1), pp. 120–125. DOI: 10.1186/1756-3305-6-85

Grandía Guzmán, R., Entrena, A. A. y Cruz H. J. (2013). "Toxoplasmosis en *Felis catus*: etiología, epidemiología y enfermedad". *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), pp. 131-149. DOI: 10.15381/rivep.v24i2.2469

Gutiérrez-Expósito, D., Tejerina, F., Fernández-Escobar, M., Ortega Mora, L. M., Gutiérrez, J., Ferreras, M. C., Pérez Pérez, V. y Benavides, J. (2018). "Impacto económico de un brote de toxoplasmosis en una granja de ovino en régimen intensivo de producción láctea", *XLIII Congreso Nacional y XIX Internacional de La Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC)*. Zaragoza, 19-21 septiembre 2018. Zaragoza, pp. 426–429. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/192814> [Consultado 04-05-2020]

Halos, L., Thébault, A., Aubert, D., Thomas, M., Perret, C., Geers, R., Alliot, A., Escotte-Binet, S., Ajzenberg, D., Dardé, M. L., Durand, B., Boireau, P. & Villena, I. (2010). "An innovative survey

underlining the significant level of contamination by *Toxoplasma gondii* of ovine meat consumed in France". *International Journal for Parasitology*, 40(2), pp. 193–200. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.06.009

Halová, D., Mulcahy, G., Rafter, P., Turčková, L., Grant, T. & de Waal, T. (2012). "*Toxoplasma gondii* in Ireland: Seroprevalence and Novel Molecular Detection Method in Sheep, Pigs, Deer and Chickens". *Zoonoses and Public Health*, 60(2), pp. 168–173. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2012.01514.x

Hassanain, M. A., Elfadaly, H. A., Shaapan, R., Hassanain, N. & Barakat, A. (2011). "Biological Assay of *Toxoplasma gondii* Egyptian Mutton Isolates". *International Journal of Zoological Research*. 7(4), pp. 330–337. DOI: 10.3923/ijzr.2011.330.337

Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., Devleeschauwer, B. (2015). "World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010". *PLoS Med*, 12(12), pp. e1001923. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001923.

Hide, G. (2016). "Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection". *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 14(3), pp. 13-15. DOI: 10.1586/14787210.2016.1146131

Hill, D. E., Chirukandoth, S. & Dubey, J. P. (2005). "Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals". *Animal Health Research Reviews*, 6(01), 41–61. DOI: 10.1079/ahr2005100

Hutchinson, J. P., Wear, A. R., Lambton, S. L., Smith, R. P. & Pritchard, G. C. (2011). "Survey to determine the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in British sheep flocks". *Veterinary Record*, 169(22), pp. 582–582. DOI: 10.1136/vr.d5764

Jackson, M. H., Hutchison, W. M. & Siim, J. C. (1987). "Prevalence of *Toxoplasma gondii* in meat animals, cats and dogs in central Scotland". *British Veterinary Journal*, 143(2), pp. 159–165. DOI: 10.1016/0007-1935(87)90007-8

Jacobs, L., Remington, J. S. & Melton, M. L. (1960). "A Survey of Meat Samples from Swine, Cattle, and Sheep for the Presence of Encysted *Toxoplasma*". *The Journal of Parasitology*, 46(1), pp. 23–28. DOI: 10.2307/3275327

Jones, J. L. & Dubey, J. P. (2010). "Waterborne toxoplasmosis – Recent developments". *Experimental Parasitology*, 124(1), pp. 10-25. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.03.013

- Juránková, J., Basso, W., Neumayerová, H., Frencová, A., Baláž, V., Deplazes, P. & Koudela, B. (2015). "Predilection sites for *Toxoplasma gondii* in sheep tissues revealed by magnetic capture and real-time PCR detection". *Food Microbiology*, 52, pp. 150–153. DOI: 10.1016/j.fm.2015.07.005
- Katzer, F., Brülisauer, F., Collantes-Fernández, E., Bartley, P. M., Burrells, A., Gunn, G., Maley, S. W., Cousens, C. & Innes, E. A. (2011). "Increased *Toxoplasma gondii* positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection". *Veterinary Research*, 42(1), pp. 121. doi:10.1186/1297-9716-42-121
- Kaye, A. (2011). "Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants". *Journal of Pediatric Health Care*, 25(6), pp. 355–364. DOI: 10.1016/j.pedhc.2010.04.008
- Khayeche, M., Mhadhbi, M., Gharbi, M., Nasfi, I. & Darghouth, M. A. (2013). "Detection of infection with *Toxoplasma gondii* in sheep slaughtered in the Governorate of Sousse (center-east of Tunisia) during the Muslim Feast (Eid al-Adha), and analysis of risk factors". *Bulletin of the Society of Exotic Pathology*, 107(1), pp. 60–63. DOI: 10.1007/s13149-014-0325-6
- Kim, K & Kasper, L. H. (2015). "Infección por *Toxoplasma gondii*". En: Kasper, D. L., Hauser, S. L., Jameson, J. L., Fauci, A. S., Longo, D. L. & Loscalzo, J. (Ed.). *Harrison - Principios de Medicina Interna* (19ª ed.). Ciudad de México: McGraw-Hill, pp. 1398–1404.
- Klun, I., Djurković-Djaković, O., Katić-Radivojević, S. & Nikolić, A. (2006). "Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: Seroprevalence and risk factors". *Veterinary Parasitology*, 135(2), pp. 121–131. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.08.010
- Lopes, A. P., Dubey, J. P., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Rodrigues, M. & Cardoso, L. (2013). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption". *Veterinary Parasitology*, 193(1–3), pp. 266–269. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.12.001
- Lopes, A. P., Vilares, A., Neto, F., Rodrigues, A., Martins, T., Ferreira, I., Gargaté, M. J., Rodrigues, M. & Cardoso, L. (2015). "Genotyping Characterization of *Toxoplasma gondii* in Cattle, Sheep, Goats and Swine from the North of Portugal. *Iranian journal of parasitology*, 10(3), pp. 465–472. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26622302/> [Consultado 14-06-2020]

- Lundén, A. & Uggla, A. (1992). "Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking". *International Journal of Food Microbiology*, 15(3-4), pp. 357-363. DOI: 10.1016/0168-1605(92)90069-F
- Mahami-Oskouei, M., Moradi, M., Fallah, E., Hamidi, F. & Asl Rahnamaye Akbari, N. (2017). "Molecular Detection and Genotyping of *Toxoplasma gondii* in Chicken, Beef, and Lamb Meat Consumed in Northwestern Iran". *Iran J Parasitol*, 12(1), pp. 38-45. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28761459/> [Consultado 14-06-2020]
- Martínez Flores, W. A., Palma García, J. M., Caballero Ortega, H., del Viento Camacho, A., López Escamilla, E., Martínez Hernández, F., Vinuesa, P., Correa, D. & Maravilla, P. (2017). "Genotyping *Toxoplasma gondii* with the B1 Gene in Naturally Infected Sheep from an Endemic Region in the Pacific Coast of Mexico". *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 17(7), pp. 495-502. DOI: 10.1089/vbz.2016.2085
- Mason, S., Quinnell, R. J. & Smith, J. E. (2010). Detection of *Toxoplasma gondii* in lambs via PCR screening and serological follow-up. *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), pp. 258-263. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.021
- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (2014). *OVILIS TOXOVAX - 1363 ESP – Prospecto*. Madrid: MSCBS.
- Mirza Alizadeh, A., Jazaeri, S., Shemshadi, B., Hashempour-Baltork, F., Sarlak, Z., Pilevar, Z. & Hosseini, H. (2018). "A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods". *Pathogens and Global Health*, 112(6), pp. 306-319. DOI: 10.1080/20477724.2018.1514137
- Mondragón, R. y Muñiz, S. (2009). "*Toxoplasma gondii*, un parásito asesino re-emergente". *Revista de Educación Bioquímica*, 28(2): pp. 52-58. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb092d.pdf> [Consultado 15-05-2020]
- Montoya, J. G., Boothroyd, J. C. & Kovacs, J. A. (2019). "*Toxoplasma gondii*". En: Bennett, J. E., Dolin, R. & Blaser, M. J. (ed). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (9ª ed.). Canadá: Elsevier, pp. 3355-3387.
- Moskwa, B., Kornacka, A., Cybulska, A., Cabaj, W., Reiterova, K., Bogdaszewski, M., Steiner-Bogdaszewski, Z. & Bień, J. (2018). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in sheep, goats, and fallow deer farmed on the same area. *Journal of Animal Science*, 96(6), pp. 2468-2473. DOI: 10.1093/jas/sky122

- Olsen, A., Berg, R., Tagel, M., Must, K., Deksné, G., Enemark, H. L., Alban, L., Vang Johansen, M., Nielsen, H. V., Sandberg, M., Lundén, A., Stensvold, C. R., Pires, S. M. & Jokelainen, P. (2019). "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs, sheep, cattle, wild boars, and moose in the Nordic-Baltic region: A systematic review and meta-analysis". *Parasite Epidemiology and Control*, 3, pp. e00100. DOI: 10.1016/j.parepi.2019.e00100
- Opsteegh, M., Dam-Deisz, C., de Boer, P., DeCraeye, S., Faré, A., Hengeveld, P., Luiten, R., Schares, G., van Solt-Smits, C., Verhaegen, B., Verkleij, T., van der Giessen, J. & Wisselink, H. J. (2020). "Methods to assess the effect of meat processing on viability of *Toxoplasma gondii*: towards replacement of mouse bioassay by in vitro testing". *International Journal for Parasitology*. DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.04.001
- Palmezano Díaz, J. M., Plazas Rey, L. K. & Rojas Carvajal, D. (2015). "Infección por toxoplasma: panorama actual". *Spei Domus*, 11(22), pp. 47–56. DOI: 10.16925/sp.v11i22.1154
- Pérez, J. E., Gómez Villada, J. S., Naranjo Pérez, O. D. & Castaño, S. V. (2011). "Formas alternas de transmisión de *Toxoplasma gondii*". *Biosalud*, 10(2), pp. 123–132. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v10n2/v10n2a12.pdf> [Consultado: 09-04-2020]
- Ragozo, A. M. A., Yai, L. E. O., Oliveira, L. N., Dias, R. A., Dubey, J. P. & Gennari, S. M. (2008). "Seroprevalence and Isolation of *Toxoplasma gondii* From Sheep From São Paulo State, Brazil". *Journal of Parasitology*, 94(6), pp. 1259–1263. DOI: 10.1645/ge-1641.1
- Robert-Gangneux, F. (2014). "It is not only the cat that did it: How to prevent and treat congenital toxoplasmosis". *Journal of infection*, 68(1), pp. 125–133. DOI: 10.1016/j.jinf.2013.09.023
- Robert-Gangneux, F., Aubert, D., & Villena, I. (2015). "Toxoplasmosis: A widespread zoonosis diversely affecting humans and animals. In: Zoonoses-Infections affecting humans and animals". Focus on Public Aspects. Editor: Andreas Sing, Springer. pp: 355-376. DOI: 10.1007/978-94-017-9457-2_14
- Rosenthal, P. J. (2017). "Infecciones por protozoarios y helmintos". En: Papadakis, M. A., McPhee, S. J. & Rabow, M. W. (ed.). *Diagnóstico clínico y tratamiento*. Ciudad de México: McGraw-Hill, pp. 1475–1516.
- Rothe, J., McDonald, P. J., & Johnson, A. M. (1985). "Detection of toxoplasma cysts and oocysts in an urban environment in a developed country". *Pathology*, 17(3), pp. 497–499. DOI: 10.3109/00313028509105508

- Satbige, A. S., Vijaya Bharathi, M., Ganesan, P. I., Sreekumar, C. & Rajendran, C. (2016). "Detection of *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Chennai using PCR and modified direct agglutination test". *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4), pp. 1466–1469. DOI: 10.1007/s12639-015-0713-x
- Sánchez-Sánchez, R., Vázquez, P., Ferre, I. & Ortega-Mora, L. M. (2018). "Treatment of toxoplasmosis and neosporosis in farm ruminants: state of knowledge and future trends". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(15), pp. 1304–1323. DOI: 10.2174/1568026618666181002113617
- Sinai, A. P., Knoll, L. J., & Weiss, L. M. (2020). "Bradyzoite and sexual stage development". En: Weiss, L. M. & Kim, K. (ed.) *Toxoplasma gondii. The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods* (3ª ed). Academic Press, pp. 807–857. DOI: 10.1016/B978-0-12-815041-2.00018-9
- Stelzer, S., Basso, W., Benavides Silván, J., Ortega-Mora, L. M., Maksimova, P., Gethmann, J., Conraths, F. J. & Schares, G. (2019). "*Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact". *Food and Waterborne Parasitology*, 15, pp. e00037. DOI: 10.1016/j.fawpar.2019.e00037
- Sullivan, W. J. & Jeffers, V. (2012). "Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency". *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), pp. 717–733. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00305.x
- Tagel, M., Lassen, L., Viltrop, A. & Jokelainen, P. (2019). "Large-scale epidemiological study on *toxoplasma gondii* seroprevalence and risk factors in sheep in Estonia: age, farm location, and breed associated with seropositivity". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(6), pp. 421–429. DOI: 10.1089/vbz.2018.2343
- Tamay de Dios, L, Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), pp. 70-78. Disponible en: <http://ddt.inr.gob.mx/indiscap/PDFIndiscap/2013/Num2/ir132d.pdf> [Consultado 08-05-2020]
- Tierney, L. M., Saint, S. & Whooley, M. A. (2011). *Manual de diagnóstico clínico y tratamiento* (4ª ed.). Ciudad de México: McGraw-Hill.
- Tzanidakis, N., Maksimov, P., Conraths, F. J., Kiossis, E., Brozos, C., Sotiraki, S. & Schares, G. (2012). "*Toxoplasma gondii* in sheep and goats: Seroprevalence and potential risk factors under dairy husbandry practices". *Veterinary Parasitology*, 190(3-4), pp. 340–348. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.07.020

- Weilhammer, D. R., Iavarone, A. T., Villegas, E. N., Books, G. A., Sinai, A. P. & Sha, W. C. (2012). "Host metabolism regulates growth and differentiation of *Toxoplasma gondii*". *International Journal for Parasitology*, 42(10), pp. 947-959. DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.07.011
- Weiss, L. M. & Kim, K. (2013). *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods* (2^a ed.) Elsevier.
- Wyrosdick, H. M., & Schaefer, J. J. (2015). "*Toxoplasma gondii*: history and diagnostic test development". *Animal Health Research Reviews*, 16(02), pp. 150–162. DOI: 10.1017/s1466252315000183
- Yan, C., Liang, L. J., Zheng, K. Y. & Zhu, X. Q. (2016). "Impact of environmental factors on the emergence, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*". *Parasites & Vectors*, 9(1). DOI: 10.1186/s13071-016-1432-6
- Yildiz, K., Kul, O., Gökpinar, S., Atmaca, H. T., Gençay, Y. E., Gazıyağci, A. N., Babür, C. & Gürcan, İ. S. (2014). "The relationship between seropositivity and tissue cysts in sheep naturally infected with *Toxoplasma gondii*". *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38, pp. 169–175. DOI: 10.3906/vet-1308-49